

分子内完整的侧向突出结构对鸭乙肝病毒 反转录酶启动引发至关重要

胡康洪^{1,2}, 冯辉¹, 李卉¹

(1. 中国科学院 武汉病毒研究所 病毒学国家重点实验室, 武汉 430071;

2. 德国雷根斯堡大学 分子和细胞解剖学研究所, 雷根斯堡 D-93053)

摘要:通过构建鸭乙肝病毒 (D) 的 RNA 文库并利用指数级富集的配体系统进化技术 (SELEX) 筛选的策略, 获得与反转录酶 (P 蛋白) 高度亲和的适配子 (Aptamer), 再通过体外引发实验和核酸酶切割方法测定全部适配子的 RNA 二级结构, 以研究鸭乙型肝炎病毒 (Duck Hepatitis B Virus, DHBV) 中对启动 P 蛋白引发步骤至关重要的结构信息。本研究发现凡是支持 P 蛋白启动引发的高亲和力适配子中均包含完整的侧向突出结构; 而一旦侧向突出被破坏, 则适配子均不再支持 P 蛋白启动引发。本研究的结果表明 D 分子内部的一个完整侧向突出结构对于 P 蛋白启动引发是必不可少的。

关键词:鸭乙型肝炎病毒; 反转录酶; 侧向突出

中图分类号: R373.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2009)04-0296-07

乙肝病毒 (Hepatitis B Virus, HBV) 属嗜肝 DNA 病毒科, 能引起宿主发生乙型肝炎^[1,2]。HBV 感染宿主细胞后, 3.2 kb 的 HBV 松弛型环状 DNA (RC DNA) 基因组首先在宿主细胞核内转化为共价闭合环状 DNA (ccc DNA), cccDNA 继而在宿主 RNA 聚合酶的作用下转录产生前基因组 RNA (Pregenomic RNA, pgRNA), pgRNA 进入细胞质并经翻译产生衣壳亚单位和病毒反转录酶 (P 蛋白), 后者立即结合至 pgRNA 的 5' 端附近的茎环结构上, 启动衣壳亚单位装配和反转录起始 (图 1)。在反转录合成 HBV 负链 DNA 之前, HBV P 蛋白首先需要以分子内的侧向突出 (Bulge) 结构为模板, 合成 3~4 个寡核苷酸作为反转录合成过程的起始引物, 该引物共价地结合至 P 蛋白 TP 区内第 63 位的 Tyr 残基上 (在鸭乙肝病毒中为第 96 位氨基酸残基), 上述过程称为“蛋白质引发 (protein priming)”。在起始引物合成后, P 蛋白及新合成的引物转位至 pgRNA 3' 末端附近的 DR1 区, 以 pgRNA 为模板, 合成互补性 HBV 负链 DNA^[3,4]。

近年来, 对 HBV 复制机理的研究取得较大的进展, 但由于缺乏体外研究系统和 P 蛋白结构信息, 故而对 HBV 复制起始机理的研究发展滞后。

收稿日期: 2009-02-26; 修回日期: 2009-04-10

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30870131) 和中国科学院前沿领域项目 (No. 0802021SA1)

作者简介: 胡康洪 (1964-), 男, 湖北武汉人, 博士、研究员、博士生导师, 主要研究领域为肝炎病毒分子生物学, Tel: 86-27-87198362, 49-941-3819808; E-mail: hukgh@wh.iov.cn

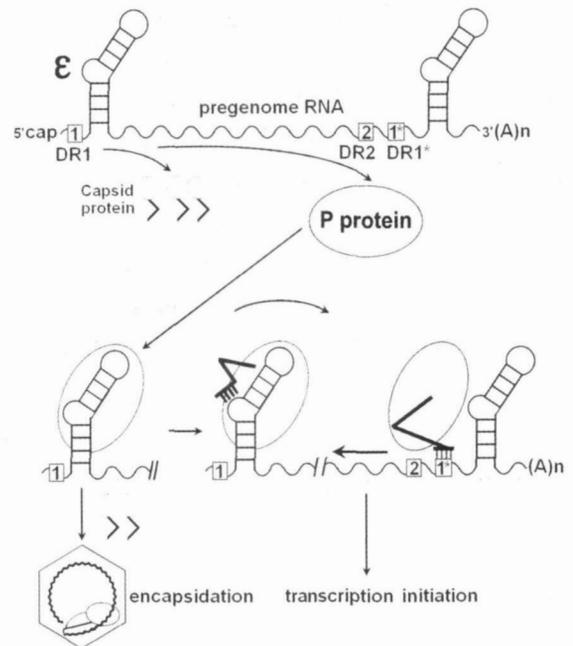


图 1 HBV 复制起始机理示意图

Figure 1 Schematic illustration of the HBV replication initiation

最先取得突破的是利用兔网织红细胞裂解液 (Rabbit reticulocyte lysate, RL) 成功重建鸭乙肝病毒 (DHBV) P-复合物, 并用该复合物启动了蛋白质引发反应, 使得体外研究 P-的相互作用成为可能^[5-7]。尽管 DHBV 与 HBV 不完全相同, 但其基因组复制的基本特征是高度保守的。因此, DHBV 可作为研究 HBV 复制机理的一个良好模型^[8]。

是由下茎、上茎、顶端环和侧向突出结构组成的一个 RNA 茎环结构。利用上述体外重建系统,

通过向鸭乙型肝炎病毒 (D) 结构中引入碱基突变可以鉴定对 P 蛋白结合和启动引发起重要作用的序列和/或结构元件。但长达 57nt 的 D RNA 茎环结构使传统的位点特异性突变分析法难以有效发挥作用, 因为分子内部甚至单个核苷酸的突变都会导致完全改变的 D RNA 二级结构, 从而破坏与 P 蛋白相互作用所必需的结构元件。为克服这个缺点, 我们此前构建了 D 突变体文库^[9], 经过 SELEX 筛选、克隆和测序, 共鉴定了 15 个与 P 蛋白强结合的适配子 (S1-S15)。本研究对这些适配子的体外结合能力和体外启动引发的能力进行定量分析, 并逐一分析这些适配子的 RNA 二级结构, 旨在揭示 D 中对 P 蛋白启动引发至关重要的结构元件。

材料与方法

1 菌株 大肠杆菌 (*Escherichia coli* Top10) (Invitrogen)。
2 质粒的构建 pT7AMVpolDHBV16-N-His6^{3'eps}^[10] 是编码带组氨酸标签的 DHBV P 蛋白的质粒, 用于体外翻译 P 蛋白。该质粒包括以下主要元件: T7 启动子、完整 DHBV P 蛋白的 ORF (位于第 170~2 530 位核苷酸位置之间的序列) 以及插在 P 蛋白 ORF 氨基端第二与第三密码子之间的 6 个连续组氨酸密码子。

表达完整 DHBV 基因组的质粒源于 pCD16^[9]。pCD16 包含比 DHBV16 菌株基因组稍长的 DNA 序列 (位于第 2 520~3 021/1~2 816 位核苷酸位置的序列), 并且该序列处于巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) IE 启动子/增强子的控制下。含有选定适配子序列的 pCD16 衍生质粒通过 PCR 介导的诱变反应 (PCR-mediated mutagenesis) 获得。野生型 D RNA 通过体外转录 pBD wt 质粒获得, 其中 pBD wt 质粒含有第 2 520~2 652 核苷酸位置的 DHBV16 序列。

3 一步法体外转录和翻译 P 蛋白 DHBV P 蛋白通过在兔 RL 中利用 TNT T7 转录/翻译系统 (Promega) 对 pT7AMVpolDHBV16-N-His6^{3'eps} 质粒进行连续体外转录和翻译而获得。标记新合成的 P 蛋白的方法如下: 添加 25 μCi ³⁵S 标记的甲硫氨酸 (1 000 Ci/mmol, Amersham/Pharmacia) 于 50 μl 反应体系中。

4 体外转录获得 RNA 文库 T7 RNA 聚合酶介导的转录反应如已发表文章中所描述操作^[9,11]。使负链寡聚核苷酸链 DepsN4LN4(-) 和正链寡聚核苷酸链退火以形成含有 T7 启动子的部分双链 DNA 作为转录模板, 利用 T7 MEGA shortscript 试剂盒 (Ambion) 转录获得初始 RNA 文库。完整的寡聚核苷酸 DepsN4LN4(-) 的互补序列为 5'-GAAT-TAA TA CGA CTCA CTA TA GGGCTGCCAAGGTATCTTTAC-GICTACNNNNCTGTTGTNNNNHTTGACTGTACCTTTGGT-ACCCCTT-3', 其中粗体部分为 D 序列, 斜体部分为 T7 启

动子序列, 随机序列部分用加下划线的 N 表示。合成的寡聚核苷酸文库和转录产生的 RNA 的品质和量通过 12% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染法进行分析, 并通过测定在 260 nm 上的紫外光吸收值来确定前述 RNA 的浓度。按照类似于前述过程的操作步骤获得 SELEX 筛选过程中的后续 RNA 文库, 即利用 RT-PCR 获得的产物做模板转录后即可。

5 体外引发反应 在 30 于兔 RL 体系中体外翻译 P 蛋白 1 小时后, 添加野生型或突变型 D RNA (若无特殊说明, D RNA 的终浓度均为 1 $\mu\text{mol/L}$)³⁰ 继续孵育 1 h, 使二者形成 P-D 复合物。然后, 在 10 μl 含 P-D 复合物的兔 RL 体系中加入等体积的含有非标记 dCTP、dGTP、dTTP 及 0.5 μl ³²P 标记的 dATP (3 000 Ci/mmol; Amersham) 的 2 倍引发缓冲液 (终浓度: 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 6 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L NH₄Cl, 2 mmol/L MnCl₂, 0.2% NP-40, 0.5 mmol/L 亚精胺, 0.06% β -巯基乙醇), 37 反应 1 h, 然后加入含 2% SDS 的 SDS-PAGE 上样缓冲液终止反应。终产物通过 SDS-PAGE (7.5% 聚丙烯酰胺, 0.1% SDS) 分离。凝胶通过 X-射线或 Fuji BAS 1 500 磷屏影像分析仪观察, 用 MacBas 软件进行定量分析。

6 RNA 的内源性标记和外源性标记 内源性标记指体外转录时通过加入 ³²P 标记的 UTP 标记 RNA; 外源性标记指利用磷酸激酶和 ³²P ATP (5 000 Ci/mmol) 去磷酸化和再次磷酸化 RNA, 得到 5 端标记的 RNA, 详细描述见^[9,11]; 未标记的剩余 NTP 经过 Quick Spin columns (Roche) 分离去除。作为酶的结构探针的 RNAs 通过变性凝胶电泳进行纯化并溶解于终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 TE 缓冲液中 (放射比活 2 $\times 10^5$ cpm/pmol)。

7 亲和层析法体外筛选与 P 蛋白结合的 RNA 在 50 μl 体外翻译反应系统 (RL) 中加入终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 RNA 文库,³⁰ 孵育 1 h。然后加入含 50 μl Ni²⁺ NTA 琼脂糖珠 (Qiagen) 的结合缓冲液 400 μl (0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 0.1% (v/v) NP-40, 100 mg/mL 酵母 tRNA), 继续孵育 1h。反应结束后, Ni²⁺ NTA 琼脂糖珠先用 1ml 预冷的结合缓冲液洗两次, 再用 1 ml TMK 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L MgCl₂, 40 mmol/L KCl, 100 mg/mL 酵母 tRNA) 洗涤两次, 以除去未结合的 RNAs 和 RL。最后, 将 Ni²⁺ NTA 琼脂糖珠悬浮于 100 μl TMK 缓冲液中, 用苯酚抽提以纯化与 P 蛋白结合的 RNA。将 RNA 用乙醇沉淀后, 再溶解于 20 μl TE 缓冲液中。

8 RT-PCR 扩增, 手工测序和克隆 1 μl RNA 适配子溶液用 Superscript II 反转录酶 (Gibco/BRL) 进行反转录, 用 100 mmol/L NaOH 水解去除 RNA 模板, 再用 Taq DNA 聚合酶 (Promega) 进行扩增。扩增产物直接以 Thermo Sequenase Cycle Sequencing (USB, Cleveland, USA) 试剂盒进行手工测序, 其中手工测序的目的是获得同一随机位点经 Selex 富集后在 A、T、G 和 C 分布上的变化。最后, 将经 9 轮循环筛选

后获得的 RT-PCR 产物,通过两端预先设置的 *Bam* HI 和 *Eco* RI 位点克隆到 *pUC18* 中,然后对所得 15 个克隆子的质粒 DNA 分别测序(S1-S15)。

9 RNA 结合竞争 P 蛋白检测法 RNA 与在体外翻译的 ³⁵S-Met 标记 P 蛋白结合。翻译体系在 30 反应 1 h 后,加入 ³²P 内源性标记的野生型 D RNA (终浓度为 50 nmol/L) 及 1 μmol/L 未标记的经 9 轮 Selex 筛选的 RNAs,继续孵育 1 h;然后,与 P 蛋白结合的 RNA 用 Ni²⁺ NTA 琼脂糖珠富集。连续洗涤四次,再将 Ni²⁺ NTA 琼脂糖珠与 200 μl SDS-PAGE 上样缓冲液、80 μl 的 1 mol/L 咪唑 (pH7.5) 和 80 μl 的 0.5 mol/L 的 EDTA (pH8.0) 混合,以释放 Ni²⁺ NTA 琼脂糖珠中与 P 蛋白结合的 RNA。取 20 μl 上清液样品通过 SDS-PAGE 分析 (14% 聚丙烯酰胺,0.1% SDS)。³²P 标记的 RNA 经 ³⁵S 标记的 P 蛋白校正后,通过磷屏成像系统定量。

10 RNA 结合直接检测法 将 ³²P 内源性标记的 RNA (终浓度 50 nmol/L) 加入前述体外翻译系统中,检测方法与方法 9 所述基本相同。用液体闪烁计数器测定每一洗脱步骤后洗脱液中 Ni²⁺ NTA 琼脂糖珠的放射活性。在洗脱四次后,与 P 蛋白结合的 RNA 由变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析并用磷屏成像系统定量。

11 RNA 二级结构分析 利用 MFOLD 软件预测 RNA 适配子的二级结构^[12]。基于能级最低原则确定其理论最优二级结构模型,再结合核酸酶图谱进行实验验证,以确定适配子的真实二级结构图谱。软件预测的具体步骤为:打开 MFOLD 主页^[12],输入 RNA 适配子的一级核酸序列,根据所分析 RNA 的特点设置相应参数 (如无特殊要求,可按照默认参数设置),选定结果输出格式后,运行“Run”菜单,保存最优的二级结构模型结果即可。RNA 二级结构核酸酶谱

方法如下:用 5' 末端端标记的 RNA 转录物进行二级结构测定^[13]。将 RNA 先变性并随后复性,将包含 5 × 10⁴ cpm 的各个待测样品溶解于 50 μl 含有 100 μg/mL 酵母 tRNA 的 TMK 缓冲液中,随后在室温下与下述核酸酶之一分别混合:RNA 酶 A (用于切除未配对的嘧啶;每个反应 1 ng,反应时间 1 min) 或 RNA 酶 T1 (用于切除未配对的 G;每个反应 2 U,反应时间 10 min) 或 CL3 核酸酶 (用于切除未配对的 C;每个反应 4 U,反应时间 5 min)。通过苯酚抽提终止酶切反应,酶切产物经沉淀后通过 8% 变性 PAGE 及放射自显影法分析。5' 端标记的野生型 D RNA 用 50 mmol/L Na₂CO₃ (pH9.0) 溶液在 90 处理 15 min 以产生碱性梯带 (Alkaline ladders),由于每一个核苷酸可被连续切开,从而充当定位 marker 的作用。在变性条件下对样品进行 RNA 酶 T1 消化能得到 G 特异性梯带 (含 G 的全部位置均被切开)。

结 果

1 D 适配子的获得及序列测定

利用 DHBV 系统,我们在 D 的上茎中引入 8 个随机核苷酸序列,建立了 文库,经过连续 9 轮 SELEX 筛选,筛选产物克隆及测序,得到一批与 P 蛋白高度亲和的适配子 (表 1),其中 S5 的序列与 S1 相同,S9 和 S10 的序列与 S4 相同,S11 及 S14 的序列与 S12 相同,故在表 1 不再重复列出。在随机序列 N 以外出现的区别于 Wt 的个别核苷酸因 SELEX 筛选中的 PCR 扩增错误造成。

表 1 D 适配子的序列测定结果

Table 1 Sequences of the 9 round SELEX-derived D aptamers

	5	Bulge	NNNN	NNNN	3
Wt-D	UGCCAA GGUAU	<u>CUUUAC</u>	GUCUAC	AUUG	CU GU U GU CGUG U GU GAC U GU ACCUUU GGUA
S1 (S5)G	AACGG.. CCAC
S3	CUGG	A..... CCAC
S4 (S9, S10)	CCAA CCAU
S12 (S11, S14)	CCAC CCAC
S13	CAU CAU -A
S2	C.....	CCCC	...-G.. CCAC -A.....
S6	C.....	CCCC CCAA -A.....
S7	CC.....	CCAA CCUU
S8	CCCA CCAA
S15	CUAG	...-A.. AAC -C.. G

2 D 适配子的体外结合活性和体外引发活性的测定

对筛选所得适配子的体外结合能力进行定量测定。实验结果表明 (图 2A),与野生型 D (相对比值为 1) 相比,S1、S2、S3、S12 和 S13 的 P 蛋白体外结合能力均明显优于野生型 D (介于 12 至 42 之间),其中 S1 和 S2 尤为突出,它们的体外结合能力分别

是野生型 D 的 42 倍和 25.5 倍;S4、S6 和 S7 的 P 蛋白体外结合能力则与野生型 D 的 P 蛋白体外结合能力相差不大,分别为 0.98、1.7 和 0.80;S15 的 P 蛋白体外结合能力是野生型 D 的 0.30;而 S8 几乎没有检测到体外结合信号,故它是非特异性吸附后的筛选产物。

随后,我们又对突变型适配子的体外引发活性

进行定量测定。实验结果见图 2B,与野生型 D (相对比值为 1) 相比, S1、S3、S4、S12 和 S13 均表现出不同程度的体外引发活性(介于 0.36 至 4.0 之间), 其中 S1 的体外引发活性是野生型 D 的 4 倍; S2、S6、S7、S8 和 S15 的体外引发活性均明显劣于野生型 D (介于 0.03 至 0.16 之间)。

由此,依据体外引发活性的实验结果,我们将筛选所得的 D 适配子分为两类:一类为明显具有体外启动活性的适配子,包括 S1、S3、S4、S12、S13;另一类为几乎不具备体外引发活性的适配子,包括 S2、S6、S7、S8、S15(图 2,B)。

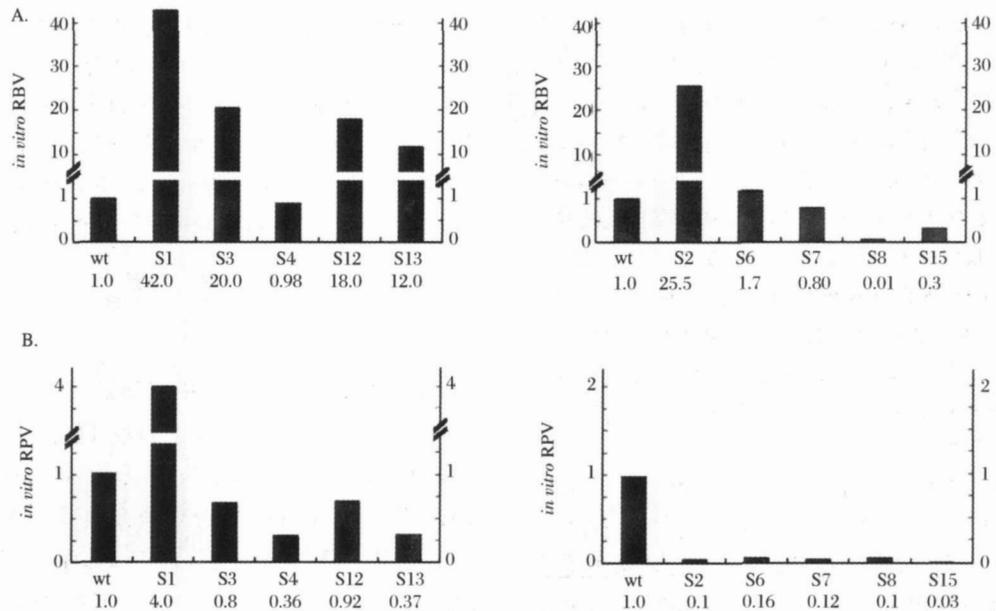


图 2 D 适配子结合活性和引发活性的体外测定

Figure 2 Quantitative analysis of the binding activity and the priming activity of the SEL EX-derived aptamers. The results are given as means \pm SD from three independent experiments, each determined in duplicate

A. The relative binding value (RBV) of aptamers: the *in vitro* direct binding activity of wt D for P protein is defined as 1, RBV is the ratio of the direct binding activities between aptamer D and wt D; B. The relative priming value (RPV) of aptamers: the *in vitro* priming activity of wt D is defined as 1, RPV is the ratio of the priming activities between aptamer D and wt D.

3 D 适配子的 RNA 二级结构分析

我们用核酸酶切方法对上述二类适配子的 RNA 二级结构逐一进行分析(图 3,A)。根据 RNA 二级结构的理论预测^[12]及核酸酶谱实验验证,我们确定了全部适配子 RNA 的真实二级结构(图 3,B)。结果表明,凡具备体外引发活性的第一类适配子均包含完整的侧向突出结构;相反,侧向突出结构被破坏的第二类适配子均没有体外引发活性,尽管它们分子内对应的序列 CUUUAC 仍存在,表明完整的侧向突出结构对引发至关重要。另外,全部 15 个 SEL EX 筛选的适配子中,具备开环的上茎结构的适配子达 10 个(图 3 B 中用下划线标示),分别为 S1、S5(其序列与 S1 相同)、S6、S7、S4、S9(其序列与 S4 相同)、S10(其序列与 S4 相同)、S11(其序列与 S12

相同)、S12、S14(其序列与 S12 相同),占总适配子的 2/3,表明与 wtD 相比,D 分子内具备的开环上茎结构有利于与 P 蛋白结合。

讨 论

D 是由 57 个核苷酸组成的一个 RNA 茎环结构(图 3,A),该结构与 HBV 反转录酶即 P 蛋白之间的相互作用对 HBV 的复制起始及衣壳包装至关重要^[3,4]。而与 P 蛋白的结合以及 P 蛋白准确地启动引发无疑是 P- 相互作用的核心所在。但由于传统实验技术的局限,对 P- 相互作用的信息知之甚少。因此,研究 HBV 中对于启动蛋白质引发步骤至关重要的 结构信息不仅对揭示 HBV 的复制

起始机理有理论指导意义,而且对筛选有效的抗 HBV 药物有重大价值。

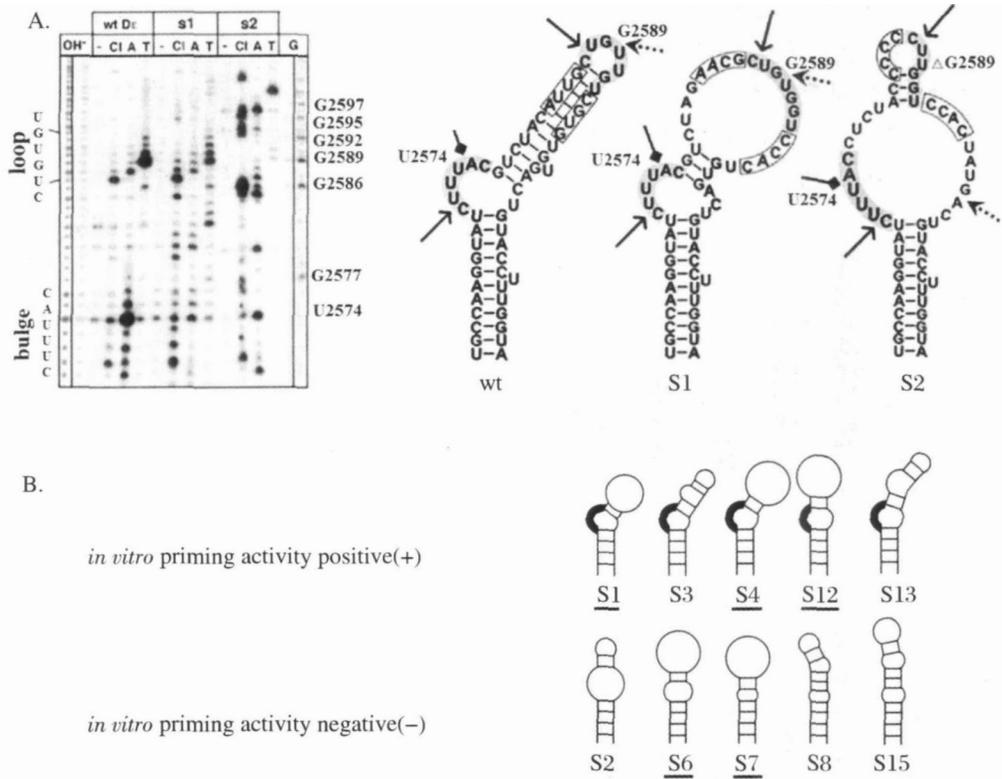


图 3 De RNA 适配子的二级结构分析

Figure 3 Secondary structure analysis of the 9 round SELEX-selected aptamers

A. 12% denatured PAGE for nuclease probing of wt, S1 and S2. ◆ indicates RNAse A cleavage site; → indicates RNAse T1 cleavage sites; → indicates CL3 cleavage site; B. According to the results of the *in vitro* priming assay, all aptamers are divided into two classes, Classe I and II. Classe I includes those aptamers with positive priming activities, and classe II negative priming activities. Structure analysis indicates that all aptamers of class I contain bulge element but those of classe II lack it.

本文结合 SELEX 筛选技术、体外重组方法检测结合活性和引发活性以及核酸酶 RNA 二级结构分析等方法,对经过 9 轮 SELEX 筛选后所得的一批适配子进行体外分析。在实验技术方面有如下优点:(1) SELEX 技术从其诞生之日到现在,历经短短十几年时间即发展为有力的筛选平台,其优势在于在分子内部某区域连续引入随机核苷酸以建立文库进行筛选,能够毫无倾向性地对分子内重要的序列/结构进行综合分析;另外,SELEX 技术相对于单克隆抗体技术所需筛选时间短,却能达到与抗原/抗体相互作用可比较的特异性^[14]。(2)传统的 RNA 结构研究往往采用位点特异性突变技术,与之相比,核酸酶 RNA 二级结构分析法既方便快捷,又不失准确性。尤其适用于相对“巨大”的茎环结构(如 结构)且同时需要分析多个目标适配子的情况,核酸酶法无疑为系统性结构分析实验提供了一种有力的工具。当然,SELEX 技术也有其缺点,如它必须以高

效文库为基础并且可能存在假阳性结果,本研究中的 S8 即由筛选的假阳性结果产生,尽管经历 9 轮筛选,但却检测不到其体外结合活性。

另外,通过本研究也可以清楚地发现在 DHBV 基因组复制过程中,P 蛋白与 -RNA 结合和 P 蛋白启动引发是两个独立事件。即:P 蛋白与 的结合后,还需通过结构重排形成代谢稳定的中间结构,才能触发蛋白质引发反应^[9,13]。当 -RNA 二级结构上的侧向突出消失或者遭到破坏时,与 -RNA 结合的 P 蛋白不能有效地启动蛋白质引发反应;而只有 -RNA 的二级结构中保留完整的侧向突出结构时,P 蛋白才可能正常启动引发过程。可见,充当引发模板的侧向突出结构本身就是蛋白质引发反应必需的结构元件。我们推测,这种突出结构促进 分子在空间上向 P 蛋白 TP 区的 Tyr 残基靠近。本研究中的 S1 和 S2 具有很强的 P 蛋白体外结合能力(分别是野生型的 42 倍和 25 倍),且其体外引发相对值

也最具代表性(分别是野生型的 4 倍和 0.1 倍),是继续进行体内研究的理想实验材料。尤其是 S2,最近的研究证实,它在体内有能力竞争性争夺 P 蛋白,由于引发能力的缺陷,使病毒 DNA 反转录停滞^[15],从而可以作为 RNA 诱饵干扰野生型 DHBV 复制。

至此,我们首次证明了在 D 分子内:(1)具备开环的上茎结构有利于和 P 蛋白结合;(2)分子内完整的侧向突出结构对 DHBV 反转录酶的启动引发至关重要。这些实验结论的得出,不仅丰富了 HBV 复制起始机理的内容,也为今后设计竞争性结合 P 蛋白的抗 HBV 诱饵分子提供了极有价值的参考性药物靶^[16]。

参考文献:

- [1] Ganem D, Prince A M. Hepatitis B virus infection - natural history and clinical consequences[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350:1118-1129.
- [2] 胡世平,陈少辉. 慢性病毒性肝炎的临床分子生物学研究与基因治疗[M]. 北京:军事医学科学出版社,2002:122-137.
- [3] Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way[J]. *Virus Res*, 2008, 134:235-249.
- [4] Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13:48-64.
- [5] Wang G H, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis[J]. *Cell*, 1992, 71:663-670.
- [6] Hu J, Toft D, Anselmo D, et al. In vitro reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins[J]. *J Virol*, 2002, 76: 269-279.
- [7] Beck J, Nassal M. Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:36128-36138.
- [8] Schultz U, Grgacic E, Nassal M. Duck hepatitis B virus: an invaluable model system for HBV infection[J]. *Adv Virus Res*, 2004, 63:1-70.
- [9] Hu K, Beck J, Nassal M. SELEX-derived aptamers of the duck hepatitis B virus RNA encapsidation signal distinguish critical and non-critical residues for productive initiation of reverse transcription[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32:4377-4389.
- [10] Beck J, Nassal M. A Sensitive procedure for mapping the boundaries of RNA elements binding in vitro translated proteins defines a minimal hepatitis B virus encapsidation signal[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 4364-4366.
- [11] Beck J, Nassal M. Sequence- and structure-specific determinants in the interaction between the RNA encapsidation signal and reverse transcriptase of avian hepatitis B viruses[J]. *J Virol*, 1997, 71: 4971-4980.
- [12] <http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=mfold>[DB]
- [13] Beck J, Nassal M. Formation of a functional hepatitis B virus replication initiation complex involves a major structural alteration in the RNA template[J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 6265-6272.
- [14] Feng H, Hu K H. Aptamers against viral hepatitis: from rational design to practical application[J]. *Virologica Sinica*, 2008, 23(5):315-320.
- [15] Schmit B, Hu K, Beck J, Nassal M. A priming-deficient duck epsilon variant serves as decoy to inhibit the replication of duck hepatitis B virus in vivo[J]. *J Virol*, 2009 (submitted)
- [16] 胡康洪. 乙型肝炎病毒:复制机制与基因封闭策略[J]. *中外健康文摘 临床医师* 2008, 5(8):5-7.

An Undamaged Bulge in *D* is Essential for Initiating Priming of DHBV Reverse Transcriptase

HU Kang-hong^{1,2}, FENG Hui¹, LI Hui¹

(1 State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;

2 Institute of Molecular and Cellular Anatomy, University of Regensburg, Regensburg, D-93053, Germany)

Abstract : Previously, we have established an aptamer library and selected out a series of RNA aptamers with higher affinity to P protein based on the *in vitro* Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) in duck hepatitis B virus (DHBV) system. In order to study the structural elements within the *D* region that is essential for initiating priming of HBV reverse transcriptase (P protein), all selected aptamers were subjected to *in vitro* priming assay and RNA secondary structure probing. We found that all those aptamers supporting priming had an undamaged bulge, while those lacking of the bulge no more support priming. Our results suggest an undamaged bulge within *D* is indispensable for initiating priming of P protein.

Key words : DHBV; reverse transcriptase; bulge

Corresponding author: HU Kang-hong, Tel: 86-27-87198362, 49-941-3819808, E-mail: hukgh@wh.iov.cn